

## 特発性正常圧水頭症の病因、診断と治療に関する研究

研究分担者 橋本 康弘 福島県立医科大学教授

### 研究要旨

髄液中には糖鎖修飾が異なるトランスフェリン・アイソフォームが存在する（髄液型 Tf-1 および血清型 Tf-2）。特発性正常圧水頭症では、血清型 Tf-2/髄液型 Tf-1 が増加する。髄液中のトランスフェリンを全自動分析装置にて迅速測定する方法の確立を目指した。

### A. 研究目的

特発性正常圧水頭症(gNPH)の診断マーカー候補である髄液中トランスフェリン(Tf)の全自動分析装置によるハイスループット法を開発し、多施設・多検体での測定を目指した。

臨床検体は、患者様の同意に基づいて使用している。また、本研究は、福島県立医科大学倫理委員会にて承認されている（承認番号：2466）。

### B. 研究方法

(1) ウェスタンブロット法による髄液 Tf の解析

髄液型 Tf-1 および血清型 Tf-2 は、ウェスタンブロット法にて 2 本のバンドとして分離される。それぞれのバンド・シグナルの強度を定量し、血清型 Tf-2/髄液型 Tf-1 の比率を Tf インデックスとして定義した。

(2) 全自動分析装置による髄液 Tf の解析

我々は、糖鎖認識分子（レクチン）が抗原分子の糖鎖に結合すると抗原-抗体反応が阻害される現象を見出した（レクチン阻害法）。この測定原理を全自動分析装置に応用して Tf 糖鎖アイソフォームの迅速測定を行った。

### C. 研究結果

(1) ウェスタンブロット法による髄液 Tf の解析

昨年度の分析症例では、髄液シヤント術を施行した 96 例のうち、78 例（81%）で治療効果を認めた。効果を認めなかった 18 例との間で Tf インデックス値は有意差を示した（ $p = 0.05$ ）。ROC 曲線に基づきカットオフ値を 2.18 とすると、Tf インデックス値の感度および特異度はそれぞれ 73%および 63%であった。

(2) 全自動分析装置による髄液 Tf の解析

レクチン阻害法では、レクチンの持つ糖鎖への結合特異性および親和性が重要である。

各種レクチンのスクリーニングにより、SSAレクチンが血清型 Tf-2 に強く結合し、レクチン阻害法に最適であることが示された。一方、髄液型 Tf-1 に強い結合性を示すレクチンは見出されなかった。そこで、定量可能な total Tf の値を用いて、 $[\text{total Tf}] - [\text{血清型 Tf-2}] = \text{髄液型 Tf-1}$  のように間接的に髄液型 Tf-1 を算出した。

ウェスタンブロット法による測定では、熟練した研究者による 2 日間の実験操作が必要であった。一方、全自動分析法では 12min/assay の迅速測定が可能であった。395 例の分析を行ったが、コントロール群と疾患群の間で Tf インデックス値に有意差は認められなかった。同じサンプルをウェスタンブロット法にて測定し、測定方法による定量値の相関を求めた。血清型 Tf-2 は 2 つの方法で  $r^2 = 0.718$  と高い相関を示したが、髄液型 Tf-1 は  $r^2 = 0.598$  と相関が低かった。

#### D. 考察

ウェスタンブロット法では、コントロール群と疾患群で有意差が認められた。一方、全自動分析法では、両者の間で有意差が認められなかった。ウェスタンブロット法では、髄液型 Tf-1 および血清型 Tf-2 を抗体にて直接的に定量している。一方、全自動分析法では、血清型 Tf-2 は直接定量を行っているのに対し、髄液型 Tf-1 は間接的に算出しているため、正しい値が得られなかったと考えられる。

今後は、髄液型 Tf-1 結合性のレクチンをスクリーニングし、両アイソフォームを直接的に全自動分析する方法を開発する予定であ

る。

#### E. 結論

髄液中 Tf の測定は、特発性正常圧水頭症のマーカーとなりうる。しかし、その測定にはウェスタンブロット法が必要であり、時間と手間を要する。新たな Tf 糖鎖アイソフォーム測定法としてレクチン阻害法を検討した。レクチン阻害法ではターゲット糖鎖に強い結合性を示すレクチンプローブの同定が必要であることが示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Keiko Akasaka-Manyu, Masaki Kawamura, Hiroki Tsumoto, Yuko Saitoh, Shinobu Kitazume, Hiroyuki Hatsuda, Yuri Miura, Shinichi Hisanaga, Shigeo Murayama, Yasuhiro Hashimoto Hiroshi Manyu and Tamao Endo, "Excess APP O-glycosylation by GalNAc-T6 decreases A $\beta$  production", *J. Biochem.*, 161(1), 99-111, 2016
2. Hiromi Ito, Kyoka Hoshi, Fumihiko Osuka, Mitsukazu Gotoh, Takuro Saito, Hiroshi Hojo, Rei Suzuki, Hiromasa Ohira, Takashi Honda and Yasuhiro Hashimoto, "Rapid detection of alpha2,6sialylated carcinoembryonic antigen in formalin-fixed colon carcinoma tissue," *PROTEOMICS*, 16, 3081-4, 2016
3. Akioh Yoshihara, Masahiko Fukatsu, Kyoka Hoshi, Hiromi Ito, Kenneth Nollet, Yoshiki Yamaguchi, Ryotaro Ishii, Takahiko Tokuda, Masakazu Miyajima, Hajime Arai, Takeo Kato,

Katsutoshi Furukawa, Hiroyuki Arai, Akio Kikuchi, Atsushi Takeda, Yoshikazu Ugawa and Yasuhiro Hashimoto, "Subgroup differences in "brain-type" transferrin and alpha-synuclein in Parkinson's disease and multiple system atrophy", *J. Biochem.*, 160(2), 87-91, 2016 Doi: 10.1093/jb/mvw015

4. 星 京香、吉原章王、深津真彦、金子知香子、伊藤浩美、橋本康弘：“糖鎖バイオマーカーによる特発性正常圧水頭症と神経変性疾患の鑑別”、生体の科学、67(5), 498-499, 2016
5. 星 京香、吉原章王、伊藤浩美、宮嶋雅一、新井 一、宇川義一、古川勝敏、荒井啓行、橋本康弘：“認知症における糖鎖バイオマーカー”、老年期認知症研究会誌、21(1), 17-19, 2016

## 2. 学会発表

1. 村上友太、高橋浩一、星 京香、伊藤浩美、菅野真由美、齋藤 清、橋本康弘、美馬達夫：「髄液バイオマーカーによる特発性低髄液圧症候群の診断」、第18回日本正常圧水頭症学会、北九州（2017年2月4日～5日）
2. 橋本康弘：「糖鎖プローブとしてのレクチン：認知症の糖鎖マーカーの検出」、第2回レクチン技術研究会、東京（2016年12月5日）
3. 村上友太、高橋浩一、星 京香、伊藤浩美、菅野真由美、齋藤 清、橋本康弘、美馬達夫：「特発性低髄液圧症候群の診断における新たな髄液バイオマ

カーの模索」、第9回日本水頭症脳脊髄液学会、名古屋（2016年11月13日）

4. 村上友太、星 京香、菅野真由美、伊藤浩美、齋藤 清、橋本康弘、宮嶋雅一、新井 一、高橋浩一、美馬達夫：「特発性低髄液圧症候群の診断における髄液中バイオマーカー」、日本脳神経外科学会 第75回学術総会、福岡（2016年9月29日～10月1日）
5. 伊藤浩美、星 京香、大須賀文彦、後藤満一、齋藤拓朗、北條 洋、鈴木 玲、大平弘正、本多たかし、橋本康弘：「ホルマリン固定大腸癌由来の  $\alpha 2,6$  シアリル化癌胎児性抗原の検出」、第89回日本生化学会大会、仙台（2016年9月25～27日）
6. 星 京香、伊藤浩美、安部英理子、不破尚志、菅野真由美、飯島順子、村上友太、齋藤 清、高橋浩一、美馬達夫、橋本康弘：「髄液中トランスフェリン糖鎖アイソフォームと疾患」、第89回日本生化学会大会、仙台（2016年9月25～27日）
7. 今野 翠、荻谷慶喜、荻谷由貴子、菅野真由美、橋本康弘：「部位特異的 O-結合型糖鎖修飾がオステオポンチンの細胞接着活性に与える影響」、第89回日本生化学会大会、仙台（2016年9月25～27日）
8. 星 京香、村上友太、伊藤浩美、安部英理子、不破尚志、菅野真由美、飯島順子、齋藤 清、高橋浩一、美馬達夫、橋

本康弘：「髄液中トランスフェリン糖鎖アイソフォームと疾患」、第10回東北糖鎖研究会、福島（2016年8月6～7日）

9. 伊藤浩美、星 京香、大須賀文彦、後藤満一、齋藤拓朗、北條 洋、鈴木 玲、大平弘正、本多たかし、橋本康弘：「ホルマリン固定大腸癌由来の  $\alpha$ 2,6 シアリル化癌胎児性抗原の検出」、第10回東北糖鎖研究会、福島（2016年8月6～7日）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

出願番号：特願 2016-094385

出願日：2016.5.10

発明者：橋本康弘、星 京香、伊藤浩美、本多たかし、山口芳樹、長江雅倫

発明の名称：認知症の診断マーカー及びそれを用いた認知症罹患鑑別方法

所属機関：(公立大学法人) 福島県立医科大学：橋本康弘、星 京香、

伊藤浩美、本多たかし

(国立研究開発法人) 理化学研

究所：山口芳樹、長江雅倫

出願人：橋本康弘